

7) ウサギを用いた催奇形性試験 ④

(資料 No.T-23)

試験機関 :

報告書作成年 : 2008 年

[GLP 対応]

検体純度 :

供試動物 : ニュージーランドホワイト妊娠ウサギ [Hra:(NZW)]、1 群 25 匹、
交配時 ; 約 6 カ月齢、 交配時体重範囲 ; 2907~3654 g

投与期間 : 妊娠 7~28 日までの 22 日間
交尾日を妊娠 0 日とした。

投与方法 : 検体を 0.5%w/v カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁させ、0、30、
150 および 500 mg/kg の用量で、妊娠 7 から 28 日までの 22 日間、毎日 1 回強制経
口投与した。投与液量は、毎日の個体別体重に基づいて 10 mL/kg の一定とした。
対照群については 0.5%w/vCMC 水溶液を同様に投与した。

[用量設定根拠]

観察・検査項目 :

母動物 ; 動物の一般状態および生死を 1 日 2 回 (午前 1 回および午後 1 回)、投与期間中は
投与の約 4 時間後に観察し、体重を妊娠 0 日、4 日、および 7-29 日の毎日測定し
た。摂餌量は、妊娠 4-29 日に毎日測定した。妊娠 29 日に帝王切開して、黄体数、
着床数、着床位置、妊娠子宮重量、生存胎児および子宮内死亡数を記録し、外表、
内臓および子宮内容物の検査を含む肉眼的病理検査を行った。肝臓については重
量を測定した後、病理組織学的検査に供した。

生存胎児 ; 生存胎児全例を対象として、胎児重量測定、性別の判定、外表、内臓および骨格検
査を行った。

試験結果 : 概要を表 1 (母動物の所見) および表 2 (胎児の所見) に示す。

母動物に対する影響

死亡および一般状態 ; 500 mg/kg 体重/日投与群の 1 例が妊娠 24 日に死亡した。この動物では妊娠 10-15 日に摂餌量、体重および糞量の減少が認められ、妊娠 20-23 日にも再び体重が減少した。この死亡は検体投与に関連したものであると考えられた。

摂餌量減少を伴う糞量減少が 500 mg/kg 体重/日投与群で 12 例に認められ、検体投与に関連した変化であると考えられた。

糞量減少は、30 および 150 mg/kg 体重/日投与群でもそれぞれ 9 および 10 例に認められたが、摂餌量の減少はみられていないことより、これらの投与群における所見は検体投与に関連したのではないと考えられた。

その他には、検体投与に関連した変化は認められなかった。

体重 ; 体重、体重増加量、正味の体重および正味の体重増加量には、いずれの投与群においても検体投与に関連した影響は認められなかった。

摂餌量 ; 500 mg/kg 体重/日投与群では、妊娠 7-17 日における摂餌量が対照群に比して 12.7 ~ 38.7% 減少し、妊娠 7-10 日および妊娠 10-13 日間で対照群との間で有意な差がみられた。また、統計学的に有意ではないものの投与期間中 (妊娠 7-29 日) の摂餌量も軽度に減少した。この摂餌量の減少は、検体投与に関連した影響と考えられた。しかし、投与後期 (妊娠 21-29 日) における摂餌量には、対照群との間で有意な差はみられなかった。

30 および 150 mg/kg 体重/日投与群の摂餌量には検体投与の影響は認められなかった。

着床所見 ; 500 mg/kg 体重/日投与群における着床数に有意な高値がみられたが、着床は検体投与開始前の出来事であるので、検体投与との関連はないものと考えられた。その他のいずれの指標にも検体投与の影響は認められなかった。

また、妊娠子宮重量にも検体投与の影響は認められなかった。

肉眼的病理所見 ; 妊娠 29 日に剖検した動物では、いずれの投与群においても検体投与に関連した所見は認められなかった。

500 mg/kg 体重/日投与群で妊娠 24 日に死亡した 1 例では、肺の暗赤色化が観察され、子宮内には少なくとも 9 例の吸収胚が認められた。

肝臓重量 ; 150 および 500 mg/kg 体重/日投与群において、肝絶対重量の有意な増加がみられ、対照群に比べて 150 mg/kg 体重/日投与群では 13.1%、500 mg/kg 体重/日投与群では 36.2% の増加を示した。これらの投与群では、肝相対重量 (正味の体重に対する比重量) についても (統計学的解析は実施していないが) 対照群と比較して高値を示

した。これらの肝重量増加は検体投与に関連したものと考えられた。

30 mg/kg 体重/日投与群では、肝絶対重量および相対重量とも対照群の値と同様であった。

肝臓の病理組織学的検査；500 mg/kg 体重/日投与群では、肝細胞肥大（軽微～軽度）および小葉中心性肝細胞空胞化（軽微～中等度）の発現頻度に有意な増加がみられた。150 mg/kg 体重/日投与群においても、軽微な肝細胞肥大の発現頻度が有意に増加した。これらの所見は、その発現頻度および重篤度に用量との関連性がみられ、検体投与による毒性所見であると考えられた。

対照群を含む全試験群で、軽微～軽度の中間帯肝細胞空胞化が同程度の頻度（21～26%）で認められた。500 mg/kg 体重/日投与群では1例に、中等度の肝細胞空胞化（脂肪空胞化）が認められ、これは生体の適応反応または検体投与による肝臓の代謝機能の変化による二次的影響と考えられた。グリコーゲンの蓄積と考えられる小型の細胞質内空胞が、0、30 および 150 mg/kg 体重/日投与群の動物の70%以上に認められたのに対して、500 mg/kg 体重/日投与群ではその発現頻度は有意に低かった。グリコーゲン空胞の減少は、検体投与に伴う肝代謝の変化の二次的影響と考えられた。

胎児に対する影響

体重； 500 mg/kg 体重/日投与群の胎児体重が対照群の値より低く（7～7.7%）、雄胎児では有意差がみられた。しかしながら、同群では妊娠子宮重量、着床数および生存胎児数が対照群の値をやや上回っていたことから、この胎児体重の低値は、同腹児数が大きかったことによるものであり、検体投与の影響ではないと考えられた。30 および 150 mg/kg 体重/日投与群の胎児体重に影響はなかった。

性比； いずれの投与群においても、検体投与による影響は認められなかった。

外表検査； 外表奇形として、30 mg/kg 体重/日投与群で臍ヘルニアが1例、150 mg/kg 体重/日投与群で短尾が1例、500 mg/kg 体重/日投与群で小眼球が1例に認められた。これらの奇形の発現頻度に統計学的な有意差はみられなかった。

しかし、500 mg/kg 体重/日投与群における小眼球については、1例のみの発現であるものの、本試験に先立って実施された用量設定試験

において、1000 mg/kg 体重/日投与群で小眼球の発現頻度増加が認められていることから、検体投与との関連性は否定できないと考えられた。

外表変異はいずれの投与群にも認められなかった。

内臓検査； 内臓奇形として、対照群の1例に横隔膜ヘルニアおよび心房拡張、150 mg/kg 体重/日投与群の1例に動脈幹遺残、500 mg/kg 体重/日投与群の1例に球根状大動脈、痕

跡肺動脈幹および心室中隔欠損が認められた。また、肺葉無形成（右側副葉欠損）が 30、150 および 500 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 1、1 および 2 例に認められた。いずれの投与群においても、奇形の発現頻度に統計学的な有意差はみられず、用量相関性も認められなかったことから、これらの奇形は検体投与とは関連のないものであると考えられた。

内臓変異については、いずれの投与群においてもその発現頻度に統計学的有意差はみられず、検体投与に関連した影響はなかった。

骨格検査； 骨格奇形として、肋軟骨の異常が 30、150 および 500 mg/kg 体重/日投与群で各 1 例、肋骨異常を伴うまたは伴わない椎骨異常が 30 および 150 mg/kg 体重/日投与群でそれぞれ 2 および 1 例、胸骨分節の異常配列が対照群で 1 例、肋骨および頭蓋骨異常が 500 mg/kg 体重/日投与群で各 1 例に認められた。いずれの投与群においても、奇形の発現頻度には統計学的有意差も用量相関性も認められず、これらの奇形は検体投与とは関連のないものであると考えられた。

対照群を含む全試験群で骨格変異が認められたが、いずれの投与群においても、検体投与に関連した変異の増加は認められなかった。

以上の結果より、本検体をウサギの妊娠 7～28 日に投与した場合、500 mg/kg 体重/日投与群の母動物で死亡、摂餌量減少、肝細胞肥大および小葉中心性肝細胞空胞化を伴う肝臓重量の増加が認められ、150 mg/kg 体重/日投与群の母動物においても肝臓重量増加と肝細胞肥大（重篤度増加）が認められた。胎児では、500 mg/kg 体重/日投与群で 1 例に小眼球の発現が認められた。

したがって、本試験における無毒性量は、母動物で 30 mg/kg 体重/日、胎児で 150 mg/kg 体重/日と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

表 1. 結果の概要－母動物

投与群 (mg/kg 体重/日)		0	30	150	500	
一群当たりの交配雌数		25	25	25	25	
母動物	妊娠雌数	23	24	23	24	
	死亡数	0	0	0	1	
	流産数	0	0	0	0	
	生存胎児の得られた雌数	23	24	23	23	
	一般状態					
	糞量減少	4	9	10	12	
	体重	検体投与に関連した異常所見なし				
	正味の体重 ²⁾ (g)	3163.0	3165.9	3141.1	3192.1	
	体重増加量 ¹⁾ (g)	妊娠 7-10 日	23	13	22	19
		妊娠 10-13 日	52	53	24	12
		妊娠 13-21 日	136	150	145	174
		妊娠 21-29 日	68	62	45	89
		妊娠 7-29 日	279	278	237	300
		正味の体重増加量 ³⁾	-15.5	-45.0	-56.8	-24.3
	摂餌量 ¹⁾ (g/ウサギ/日)	妊娠 7-10 日	183	178	178	152↓
		妊娠 10-13 日	166	157	150	131↓
		妊娠 13-21 日	151	149	142	132
		妊娠 21-29 日	102	104	105	115
		妊娠 7-29 日	140	138	135	129
	妊娠子宮重量 ¹⁾ (g)	451.5	488.2	463.1	474.5	
肉眼的病理所見	検体投与に関連した所見なし					
肝臓重量	絶対重量 ¹⁾ (g)	85.79	85.06	97.05↑	116.87↑	
	相対重量 ⁴⁾	2.70	2.69	3.10	3.69	
肝臓の病理組織学的所見 (匹数)	壊死、凝固	0	0	0	1	
	肝細胞肥大	0	3	4 *	14↑**	
	肝細胞空胞化、小葉中心性	0	3	3	13↑**	
	肝細胞空胞化、中間帯	6	5	5	6	
	肝細胞グリコーゲン空胞化	18	17	18	3↓**	
着床所見	検査腹数	23	24	23	23	
	黄体数 ¹⁾	9.0	9.9	9.7	9.9	
	着床数 ¹⁾	8.3	9.3	8.9	9.4 ↑	
	生存胎児数 ¹⁾	7.9	8.8	8.6	8.8	
	着床前胚死亡率 ¹⁾ (%)	8.0	5.6	7.2	5.1	
	着床後胚死亡率 ¹⁾ (%)	4.6	4.8	3.4	6.2	
	早期胚吸収率 ¹⁾ (%)	4.1	3.9	2.2	5.0	
	後期胚吸収率 ¹⁾ (%)	0.5	0.8	1.2	1.2	
	胎児死亡率 ¹⁾ (%)	0	0	0	0	

¹⁾: 群平均値

²⁾: (妊娠 29 日の体重－妊娠子宮重量)

³⁾: (妊娠 0-29 日の体重増加量－妊娠子宮重量)

⁴⁾: 正味の体重に対する肝臓重量比の群平均値

統計学的有意差: ↑↓: p<0.05、↑↓↓: p<0.01. [Dunnett 検定 (体重、体重増加量、摂餌量、妊娠子宮重量、肝臓の絶対重量と相対重量、着床所見)、Fisher の直接確率計算法 (肉眼的病理所見、病理組織学的所見)]、*: p<0.05、** p<0.01. [Mann-Whitney U 検定 (病理組織学的所見)]

表 2. 結果の概要－胎児

投与群 (mg/kg 体重/日)		0	30	150	500
体重 (g) ¹⁾	雄	42.2	40.6	40.1	39.0↓
	雌	41.6	38.7	39.4	38.4
	雌雄	41.7	39.9	39.6	38.8
性比 (総雄胎児数/総生存胎児数)		51.6	48.3	51.1	52.4
検査胎児数 (腹数)		182 (23)	212 (24)	197 (23)	202 (23)
総奇形胎児数 (総奇形胎児所有腹数)		2 (2)	6 (6)	5 (5)	7 (6)
外表奇形	奇形胎児数 (奇形胎児所有腹数)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
	臍ヘルニア	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	短尾	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	小眼球	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
内臓奇形	奇形胎児数 (奇形胎児所有腹数)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	3 (2)
	痕跡肺動脈幹	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	心室中隔欠損	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	球根状大動脈	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	動脈幹遺残	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	肺葉無形成	0 (0)	1 (1)	1 (1)	2 (1)
	横隔膜ヘルニア	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
心房拡張	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
骨格奇形	奇形胎児数 (奇形胎児所有腹数)	1 (1)	4 (4)	2 (2)	3 (3)
	胸骨分節癒合	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	肋骨異常を伴うまたは伴わない椎骨異常	0 (0)	2 (2)	1 (1)	0 (0)
	肋骨異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	頭蓋骨異常	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	肋軟骨異常	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
胸骨分節異常配列 (重度)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
内臓変異	副脾	24 (15)	41 (17)	33 (14)	37 (16)
	心臓－乳頭筋過剰	13 (9)	15 (10)	14 (9)	12 (8)
	主要血管変異	10 (8)	15 (8)	15 (7)	13 (8)
	下大静脈後尿管	1 (1)	1 (1)	7 (3)	2 (2)
	心臓小型化	0 (0)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
	脾臓退色	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	胆嚢欠損または小型化	4 (4)	3 (3)	8 (4)	9 (7)
	肝副葉	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肝退色	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	肝変形	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
肺副葉	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
胆嚢拡張	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
骨格変異	痕跡状第 13 肋骨	38 (19)	29 (17)	35 (18)	17↓ (11↓)
	第 13 肋骨	61 (19)	68 (18)	80 (18)	66 (17)
	舌骨弓湾曲	9 (7)	10 (8)	11 (7)	17 (8)
	第 5/6 胸骨分節未骨化	32 (12)	37 (11)	26 (11)	20↓ (9)
	胸骨分節異常配列(軽度/中等度)	1 (1)	8↑ (5)	5 (3)	2 (2)
	27 仙椎前椎骨	6 (4)	26↑ (9)	19↑ (8)	15 (8)
	25 仙椎前椎骨	3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	第 7 胸骨分節	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	第 1 胸骨分節前方に過剰骨化部位	3 (3)	3 (2)	8 (4)	2 (2)
	頸肋	10 (6)	7 (3)	6 (3)	14 (7)
	過剰頭蓋骨	3 (2)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
舌骨体/舌骨弓未骨化	2 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	
糸状付着物を伴う胸骨分節	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	

¹⁾: 群平均値

統計学的有意差: ↓: p<0.05, ↓↓: p<0.01. [Dunnett 検定 (胎児体重)、Fisher の直接確率計算法 (奇形または変異胎児数)]

(9) 変異原性

1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-24)

試験機関：

報告書作成年：2006年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* [TA98、TA100、TA1535、TA1537 株]及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli*[WP2 (pKM101)、WP2 *uvrA* (pKM101) 株]を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1 回目試験の S-9 Mix 非存在下及び存在下では 100~5000 μ g/プレートの範囲で 6 濃度についてプレート法を用いて試験した。2 回目試験の S-9 mix 非存在下では、TA98、TA1535 及び TA1537 株について 5.0~5000 μ g/プレートの範囲で 10 濃度とし、TA100、*Escherichia coli* WP2 (pKM101) 及び WP2 *uvrA* (pKM101) について 100~5000 μ g/プレートの範囲の 6 濃度でプレート法を用いて試験した。2 回目試験の S-9 mix 存在下における試験では、全ての菌株について 100~5000 μ g/プレートの範囲の 6 濃度でプレインキュベーション法を用いて実施した。試験は 3 連制 (溶媒対照については 5 連制) で実施した。

陽性判定基準；溶媒対照と比較して、一つ以上の用量で 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示し、かつ用量相関を伴う場合に、陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示す。

全ての検定菌株について、500 又は 1000 あるいは 2500 μ g/プレート以上の濃度において沈殿が認められた。

2 回の試験において、検体は S-9 mix の有無にかかわらず、全ての供試濃度で、いずれの菌株にも復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた Acridine Mutagen ICR191、Benzo[a]pyrene、2-Aminoanthracene、Daunorubicin HCl、N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine、Mitomycin C 及び Sodium Azide では、検定した全ての菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

表 1.1 回目試験 (数値は 3 反復の平均値、溶媒対照は 5 反復の平均値) プレート法

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	112.4	5.6	39.0	110.6	43.2	12.0	
検体	100	-	99.0	6.3	35.0	122.7	42.7	9.3	
	200	-	95.3	3.7	37.0	107.3	24.3	4.3	
	500	-	108.7	4.0	35.3 P	88.3 P	23.0	1.3 P	
	1000	-	95.0 P	2.7 P	30.3 P	83.7 P	20.7 P	2.3 P	
	2500	-	102.7 P	2.7 P	29.3 P	74.0 P	22.0 P	1.7 P	
	5000	-	81.7 P	2.0 P	26.3 P	83.7 P	23.3 P	1.0 P	
陽性 対照	NaZ	2	-	822.7	609.7	-	-	-	-
	ICR	2	-	-	-	-	-	-	1878.3
	DR	1	-	-	-	-	-	264.0	-
	MMC	1	-	-	-	205.3	-	-	-
	ENNG	1	-	-	-	-	357.3	-	-
溶媒対照 (DMSO)	0	+	107.8	5.6	48.0	124.8	53.4	11.2	
検体	100	+	119.0	6.3	50.3	154.0	51.7	12.7	
	200	+	111.7	7.0	46.3	139.3	51.7	10.3	
	500	+	117.0	3.7	44.3	154.3	34.3	5.3	
	1000	+	125.0 P	4.7 P	39.3 P	143.0	31.7 P	6.3	
	2500	+	97.7 P	3.0 P	38.7 P	113.3 P	32.7 P	5.7 P	
	5000	+	98.0 P	4.7 P	26.0 P	103.3 P	30.7 P	3.3 P	
陽性 対照	2AA	1	+	741.0	-	-	-	1431.7	-
		2	+	-	223.0	-	-	-	194.0
		20	+	-	-	161.0	-	-	-
	BP	5	+	-	-	-	873.3	-	-

陽性対照 NaZ : Sodium Azide
 ICR : Acridine Mutagen ICR191
 DR : Daunorubicin HCl
 MMC : Mitomycin C
 ENNG : N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 2AA : 2-Aminoanthracene
 BP : Benzo[a]pyrene

P : 沈殿が観察された。

表 2.2 回目試験 (数値は 3 反復の平均値、溶媒対照は 5 反復の平均値)

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	90.2	5.4	46.2	177.2	31.4	9.8	
検体	5.0	-	-	7.3	-	-	34.7	9.7	
	10	-	-	5.0	-	-	33.3	10.3	
	20	-	-	8.3	-	-	38.7	10.3	
	50	-	-	6.0	-	-	35.0	12.0	
	100	-	76.0	5.0	53.0	154.0	21.0	10.3	
	200	-	67.0	2.3	42.3	128.0	24.7	8.0	
	500	-	77.0	3.3	37.7 P	117.3 P	16.7	2.3	
	1000	-	74.7	3.7 P	38.3 P	93.7 P	15.3 P	0.3 P	
	2500	-	54.0 P	2.0 P	32.3 P	72.0 P	12.7 P	1.0 P	
5000	-	65.0 P	4.0 P	46.3 P	96.0 P	15.0 P	0.0 P		
陽性 対照	NaZ	2	-	850.7	517.7	-	-	-	-
	ICR	2	-	-	-	-	-	-	1436.3
	DR	1	-	-	-	-	-	296.3	-
	MMC	1	-	-	-	400.0	-	-	-
	ENNG	1	-	-	-	-	742.7	-	-
溶媒対照* (DMSO)	0	+	114.8	7.2	73.0	183.4	30.4	14.4	
検体*	100	+	123.7	4.7	90.3	162.0	45.0	13.0	
	200	+	125.7	6.5	99.7	217.3	41.0	11.0	
	500	+	104.3	2.3 P	95.0	185.0	33.3	10.3	
	1000	+	100.0 P	4.3 P	73.7 P	135.0 P	26.7	14.0 P	
	2500	+	96.3 P	3.0 P	63.7 P	138.7 P	30.7 P	14.0 P	
	5000	+	93.7 P	3.7 P	70.7 P	150.0 P	41.7 P	17.3 P	
陽性 対照	2AA*	1	+	581.3	-	-	-	1716.0	-
		2	+	-	89.3	-	-	-	77.7
		20	+	-	-	186.7	-	-	-
	BP*	5	+	-	-	-	677.7	-	-

陽性対照 NaZ : Sodium Azide
 ICR : Acridine Mutagen ICR191
 DR : Daunorubicin HCl
 MMC : Mitomycin C
 ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 2AA : 2-Aminoanthracene
 BP : Benzo[a]pyrene

P : 沈殿が観察された。

* : S-9mix 存在下の試験はプレインキュベーション法で実施した。

2) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-25)

試験機関:

報告書作成年: 2008 年

[GLP 対応]

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* [TA98、TA100、TA1535、TA1537 株]及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli*[WP2 (pKM101)、WP2 *uvrA* (pKM101) 株]を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、1 回目はプレート法、2 回目はプレインキュベーション法で試験した。試験は 3 連制とした。

用量設定根拠:

陽性判定基準; 溶媒対照と比較して、一つ以上の用量で TA98、TA100、WP2 (pKM101) 及び WP2 *uvrA* (pKM101) 株では 2 倍、TA1535 及び TA1537 株では 3 倍以上の復帰変異コロニー数を示し、かつ用量相関を伴うこと。さらに、復帰変異コロニー数の増加が試験施設における無処理対照及び溶媒対照の背景データ範囲を超えている場合、陽性と判定した。

試験結果: 結果を次表に示す。

すべての検定菌株について、1 回目の試験で 2500 µg/プレート以上、2 回目の試験では 1000 µg/プレート以上の用量において検体の沈殿が認められたが、沈殿物は測定に影響しなかった。

2 回の試験において、検体は S-9 mix の有無にかかわらず、最高濃度 5000 µg/プレートにおいても、いずれの検定菌株にも復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 4-nitro-o-phenylene-diamine、Methyl methanesulfonate、2-Aminoanthracene 及び Sodium azide では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

表 1. 1回目試験の結果 (数値は3反復の平均値) プレート法

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	128	11	93	263	31	9	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	121	14	57	263	34	10	
検体	3	-	120	10	69	281	25	10	
	10	-	134	12	60	261	26	10	
	33	-	134	17	58	241	26	8	
	100	-	128	16	58	214	29	9	
	333	-	118	16	62	250	21	12	
	1000	-	117	14	58	241	32	15	
	2500	-	114P	16P	61P	195P	22P	8P	
	5000	-	109P	11P	51P	193P	17P	4P	
陽性 対照	NaN ₃	-	2099	1963	-	-	-	-	
	4-NOPD	10	-	-	-	-	490	-	
		50	-	-	-	-	-	94	
	MMS	3.0 μL	-	-	-	2794	2962	-	-
無処理対照	0	+	137	18	89	261	52	14	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	158	20	56	257	43	18	
検体	3	+	144	19	57	282	40	10	
	10	+	153	18	68	210	36	17	
	33	+	162	15	54	222	47	17	
	100	+	144	18	51	222	41	15	
	333	+	141	17	49	228	51	12	
	1000	+	127	14	55	243	40	14	
	2500	+	159P	9P	54P	228P	29P	6P	
	5000	+	131P	7P	56P	191P	18P	3P	
陽性 対照	2-AA	2.5	+	1858	311	-	-	1490	244
		10.0	+	-	-	517	2279	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methanesulfonate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

P : 沈殿が観察された。

表 2. 2 回目試験の結果 (数値は 3 反復の平均値)

プレインキュベーション法

化合物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	128	16	94	280	36	12	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	115	20	60	254	29	12	
検 体	10	-	106	16	68	270	28	16	
	33	-	107	16	53	255	31	16	
	100	-	91	17	57	269	24	14	
	333	-	82	10	49	274	24	17	
	1000	-	67P	10P	56P	270P	25P	8P	
	2500	-	60P	12P	62P	249P	18P	8P	
	5000	-	54P	8P	62P	242P	18P	4P	
陽 性 対 照	NaN ₃	-	1833	1564	-	-	-	-	
	4-NOPD	10	-	-	-	-	612	-	
		50	-	-	-	-	-	139	
	MMS	3.0 μL	-	-	-	1176	1041	-	-
無処理対照	0	+	160	17	77	287	43	20	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	133	16	50	261	43	15	
検 体	10	+	127	14	48	266	38	17	
	33	+	137	15	55	191	45	18	
	100	+	96	19	57	174	45	17	
	333	+	107	18	69	255	38	15	
	1000	+	82P	12P	52P	155P	30P	10P	
	2500	+	74P	10P	51P	141P	23P	8P	
	5000	+	66P	11P	59P	177P	17P	11P	
陽性 対照	2-AA	2.5	+	1813	187	-	-	1072	196
		10	+	-	-	482	1998	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methanesulfonate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

P : 沈殿が観察された。

3) 細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 No.T-26)

試験機関：

報告書作成年：2010年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* [TA98、TA100、TA1535、TA1537 株]及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli*[WP2 (pKM101)、WP2 *uvrA* (pKM101) 株]を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。

検体は DMSO に溶解し、1 回目はプレート法、2 回目はプレインキュベーション法で試験した。試験は 3 連制とした。

用量設定根拠：

陽性判定基準；溶媒対照と比較して、1 つ以上の用量で 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示し、かつ用量相関を伴い、復帰変異コロニー数の増加が試験施設における無処理及び溶媒対照の背景データ範囲を超える場合、陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示す。

1 回目の試験ではすべての検定菌株について 1000 µg/プレート以上で、2 回目の試験では、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 株で 1000 µg/プレート以上の用量において、WP2 (pKM101) および WP2 *uvrA* (pKM101) 株で 2500 µg/プレート以上の用量において検体の沈殿が認められたが、沈殿物は測定に影響しなかった。

2 回の試験において、検体は S-9 mix の有無にかかわらず、最高濃度 5000 µg/プレートにおいても、いずれの検定菌株にも復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた 4-nitro-o-phenylene-diamine (4-NOPD)、Methyl methanesulfonate (MMS)、2-Aminoanthracene (2-AA) 及び Sodium azide (NaN₃) では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

表 1. 1回目試験の結果（数値は3反復の平均値） プレート法

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	142	15	221	385	32	12	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	116	15	199	353	27	14	
検体	3	-	140	14	263	409	28	13	
	10	-	106	13	200	408	29	15	
	33	-	108	16	177	350	28	14	
	100	-	106	10	168	366	29	8	
	333	-	104	17	218	410	29	12	
	1000	-	106P	14P	195P	394P	21P	14P	
	2500	-	71P	8P	122P	266P	11P	3P	
	5000	-	75P	7P	92P	248P	10P	5P	
陽性 対照	NaN ₃	-	1965	1686	-	-	-	-	
	4-NOPD	10	-	-	-	-	290	-	
		50	-	-	-	-	-	69	
	MMS	3.0 μL	-	-	-	3514	2454	-	-
無処理対照	0	+	120	21	232	484	32	21	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	112	16	171	448	37	13	
検体	3	+	123	23	219	444	39	17	
	10	+	111	20	214	458	42	13	
	33	+	110	19	177	413	36	16	
	100	+	118	17	156	425	40	14	
	333	+	95	19	206	427	37	17	
	1000	+	77P	14P	170P	385P	29P	15P	
	2500	+	89P	6P	88P	291P	14P	8P	
	5000	+	48P	5P	69P	169P	15P	3P	
陽性 対照	2-AA	2.5	+	1508	324	-	-	986	214
		10.0	+	-	-	1264	1865	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methanesulfonate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

P : 沈殿が観察された。

表 2. 2回目試験の結果 (数値は3反復の平均値)

プレインキュベーション法

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	123	15	203	364	35	16	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	100	15	183	364	27	17	
検体	3	-	86	17	191	352	25	14	
	10	-	105	15	167	347	25	16	
	33	-	83	8	160	369	23	14	
	100	-	86	15	149	347	20	14	
	333	-	72	14	155	348	20	7	
	1000	-	76P	7P	159	327	16P	8P	
	2500	-	61P	9P	112P	296P	14P	4P	
	5000	-	65P	5P	100P	284P	14P	6P	
陽性 対照	NaN ₃	10	-	1743	1455	-	-	-	-
	4-NOPD	10	-	-	-	-	-	354	-
		50	-	-	-	-	-	-	87
	MMS	3.0 μL	-	-	-	2696	2054	-	-
無処理対照	0	+	112	18	248	451	55	16	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	104	13	177	379	39	16	
検体	3	+	83	19	175	338	31	21	
	10	+	113	16	177	400	42	22	
	33	+	123	20	181	399	38	24	
	100	+	120	23	203	386	36	15	
	333	+	72	16	176	335	37	17	
	1000	+	63	9P	174	292	26P	9P	
	2500	+	73P	9P	136P	246P	24P	12P	
	5000	+	62P	8P	122P	203P	15P	10P	
陽性 対照	2-AA	2.5	+	1394	248	-	-	1387	119
		10	+	-	-	2214	2162	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide
 4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine
 MMS : methyl methanesulfonate
 2-AA : 2-Aminoanthracene

P : 沈殿が観察された。

4) マウスリンホーマ細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験

(資料 No.T-27)

試験機関：

報告書作成年：2006年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、濃度 0.63～50 µg/mL の用量に調製した。

マウスリンホーマ細胞 L5178Y *tk*^{+/-} を、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で、検体、溶媒対照あるいは陽性対照を処理した培地で 4 時間培養した。培地を除去後、変異発現期間として 48 時間細胞を培養した。発現期間終了時に培養液を 2 分し、一方には変異体を検出するためにトリフルオロチミジン (TFT) を添加し、他方には生存度を測定するために TFT を添加せずに培養した。10～13 日後に顕微鏡観察により大小の変異体コロニーを計測し、生存細胞当りの変異頻度を算出して溶媒対照における変異頻度と比較した。試験は 2 連で 3 回実施した。

陽性判定根拠：用量相関を伴う変異頻度の有意な増加が認められ、かつ細胞毒性の発現が認められない場合に陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示す。

検体は独立した 3 回の試験において、S-9 mix の非存在下及び存在下いずれにおいても、変異頻度の増加は認められなかった。

一方、陽性対照として用いたエチルメタンサルホネート (EMS) 及びベンゾ [a]ピレン (BP) では、変異頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性はないものと判断される。

結 果

試験	化合物 ($\mu\text{g/mL}$)		S-9 mix (-)			S-9 mix (+)		
			濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	相対増殖 率 (%)	変異頻度* ($\times 10^{-4}$)	濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	相対増殖 率 (%)	変異頻度* ($\times 10^{-4}$)
1 回 目	溶媒対照 (DMSO)		—	100	1.0	—	100	1.0
	検 体		0.63	101	1.1	2.5	89	1.2
			1.25	69	0.9	5	89	1.6
			2.5	89	1.1	10	81	1.3
			5	80	1.1	20	59	1.6
			10	49	1.3	30	13	1.8
			20	6	n**	40	3	n**
			30	2	n**	50	1	n**
	陽性 対照	EMS	500	41	6.5	—	—	—
BP		—	—	—	1	75	4.3	
2 回 目	溶媒対照 (DMSO)		—	100	0.9	—	100	1.8
	検 体		1	67	1.5	5	119	1.6
			2	66	0.8	10	120	1.7
			5	87	1.0	15	108	1.7
			10	70	1.0	20	101	1.1
			15	49	1.1	25	85	1.4
			20	18	1.6	30	28	2.3
	陽性 対照	EMS	500	33	9.9	—	—	—
		BP	—	—	—	1	72	8.4
3 回 目	溶媒対照 (DMSO)		—	100	0.9	—	100	1.0
	検 体		2	94	0.7	15	78	1.1
			5	94	1.1	20	81	0.6
			10	81	0.9	25	51	0.7
			15	50	0.8	30	42	1.3
			20	22	1.3	35	28	0.9
			25	19	1.5	40	14	1.5
	陽性 対照	EMS	500	68	4.1	—	—	—
		BP	—	—	—	1	69	5.1

*変異頻度：2連の平均値

**n：強い毒性により変異頻度が求められなかった。

EMS：エチルメタンサルホネート、BP：ベンゾ[a]ピレン

5) マウスリンホーマ細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (資料 No.T-28)

試験機関:

報告書作成年: 2008 年

[GLP 対応]

検体純度:

試験方法: マウスリンホーマ細胞 L5178Y *tk^{+/-}* を用いて、検体の TK 遺伝子における突然変異誘発性及び染色体異常誘発性を、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下及び非存在下で検定した。

検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、S-9 mix の非存在下では濃度 0.7~44.0 µg/mL、S-9 mix の存在下では 5.5~88.0 µg/mL のそれぞれ 6 用量とし、4 時間処理後における相対クローニング効率、細胞増殖抑制率及び変異頻度を測定した。

本試験は 2 連 (培養区 I 及び II) で 2 回実施した。

用量設定根拠:

判定基準: 溶媒対照と比較して、用量依存的な変異頻度の増加に再現性がみられ、かつ溶媒対照及び無処理対照の閾値を越える場合に陽性と判定した。

試験結果: 結果の概要を表 1 に、試験施設における背景対照データ表 2 に示す。

1 回目試験では S-9 mix 非存在下の 44.0 µg/mL で、S-9 mix 存在下の 66.0 µg/mL 以上の濃度で、2 回目試験では S-9 mix 非存在下の 33.0 µg/mL 以上で、S-9 mix 存在下の 44.0 µg/mL 以上の濃度で、それぞれ検体処理直後に相対クローニング効率の低下あるいは細胞増殖が 50% 以上抑制され、細胞毒性の発現がみられたが、各回の試験において、用量相関を伴う変異頻度の増加はみられなかった。

一方、陽性対照として用いたメチルメタンサルホネート (MMS) 及びシクロホスファミド (CPA) は、変異頻度の明らかな増加を認めた。

以上の結果から、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性は有さないものと判断される。

表 1. 本試験結果の概要

試験回	処理時間：4時間		培養区 I				培養区 II				
	化合物 ($\mu\text{g/mL}$)	S-9 mix の有無	(1) 相対 クロニク ^a 効率 ¹	(2) 最終 相対 増殖率	(3) 変異 頻度 / 10^6	(4) 閾値	(1) 相対 クロニク ^a 効率 ¹	(2) 最終 相対 増殖率	(3) 変異 頻度 / 10^6	(4) 閾値	
1回目 4時間処理	無処理対照	—	100.0	100.0	39	/	100.0	100.0	71	/	
	溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	60	186	100.0	100.0	75	201	
	検体	2.8	—	135.5	106.9		90	91.0	67.0		94
		5.5	—	122.4	73.9		109	76.2	51.5		97
		11.0	—	71.9	54.5		68	61.5	27.1		181
		22.0	—	91.6	58.6		61	73.0	34.8		85
		33.0	—	92.9	67.2		55	100.0	36.2		102
	44.0	—	21.4	5.6	58		13.0	3.7	71		
	陽性対照 (MMS)	19.5	—	77.3	24.0		261	53.9	34.6		351
	無処理対照	+	100.0	100.0	66	/	100.0	100.0	93	/	
	溶媒対照 (DMSO)	+	100.0	100.0	77	203	100.0	100.0	111	237	
	検体	5.5	+	74.2	107.1		101	110.5	121.3		73
		11.0	+	71.0	96.6		72	110.5	119.5		78
		22.0	+	74.2	108.2		76	105.0	112.9		73
44.0		+	73.1	57.9	102		87.0	52.0	92		
66.0		+	38.8	18.4	124		80.8	40.7	102		
88.0	+	4.3	-	-	14.7	-	-				
陽性対照 (CPA)	3.0	+	77.4	41.4	320	62.7	75.5	240			
	4.5	+	34.4	8.5	264	26.2	11.8	398			
2回目 4時間処理	無処理対照	—	100.0	100.0	150	/	100.0	100.0	195	/	
	溶媒対照 (DMSO)	—	100.0	100.0	161	287	100.0	100.0	135	261	
	検体	0.7	—	100.0	--**		--	122.6	--**		--
		1.4	—	124.7	142.9		157	131.2	110.7		156
		2.8	—	122.8	114.2		171	143.6	146.0		140
		5.5	—	156.8	109.9		126	131.2	98.4		225
		11.0	—	77.4	87.4		167	120.6	72.5		231
		22.0	—	101.4	77.4		145	107.9	78.8		203
		33.0	—	15.1	8.0		148	8.1***	4.1***		445***
	44.0	—	0.4	-	-	0.0	-	-			
	陽性対照 (MMS)	19.5	—	77.4	19.4	606	50.8	21.9	591		
	無処理対照	+	100.0	100.0	107	/	100.0	100.0	99	/	
	溶媒対照 (DMSO)	+	100.0	100.0	106	232	100.0	100.0	170	296	
	検体	5.5	+	61.6	69.2		113	74.6	131.2		102
11.0		+	87.1	41.3	137		108.6	117.8	108		
22.0		+	59.9	33.8	143		87.9	73.6	138		
44.0		+	22.5	8.1	178		16.9	36.3	185		
66.0		+	0.3	-	-		13.4	-	-		
88.0	+	0.0	-	-	8.0	-	-				
陽性対照 (CPA)	3.0	+	24.2	31.4	521	40.0	27.2	415			
	4.5	+	5.5	2.3	1110	16.6	3.4	1523			

(1) ~ (4) の計算方法は次頁に示す。

* : 強い細胞毒性の発現により培養を継続しなかった。

** : ガイドライン上 $4\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度について観察が規定されていないため、本濃度については培養を継続しなかった。

*** : 相対的な細胞の生存率及び増殖率がいずれも 10% 以下であったことから、数値は無効と判断された。

MMS : メチルメタンサルホネート CPA : シクロホスファミド

計算方法

(1) : クローニング効率 (播種効率) $1 = -\ln[96\text{well プレート } 2 \text{ 枚中のコロニーが生じていない well 数の合計} / (96 \times 2)] / (\text{well 当りの播種細胞数})$

相対クローニング効率 1 = 対応する対照群のクローニング効率 1 を 100 とした場合の値。

(2) : クローニング効率 2 = $-\ln[\text{コロニーが生じない well 数の平均} / 96] / (\text{well 当りの播種細胞数})$

相対クローニング効率 2 = 対応する対照群のクローニング効率 2 を 100 とした場合の値。

最終相対増殖率 = (相対増殖率 × 相対クローニング効率 2) / 100

(3) : 変異頻度 = 細胞 10^6 個当りの突然変異小コロニー数 + 突然変異大コロニー数

(4) : 閾値 = 溶媒対照における細胞 10^6 個当りの突然変異コロニー数 + 126

表 2. 変異頻度の背景対照データ 処理時間 4 時間 2005~2006 年実施試験

群	変異頻度 / 10^6 (平均値 ± 標準偏差及びデータの範囲 [])	
	S-9mix (-)	S-9mix (+)
無処理対照	91 ± 36 [41~210]	89 ± 39 [40~209]
溶媒対照	92 ± 40 [40~204]	85 ± 34 [40~203]
陽性対照	398 ± 182 [202~1582] (メチルメタンスルホネート)	385 ± 183 [209~1269] (シクロホスファミド)

6) ヒトリンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-29)

試験機関：

報告書作成年：2006年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：健康な非喫煙者（男女各2名）より採取した末梢血リンパ球細胞を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9 mix）の存在下では、2回の試験ともに20、30、50 µg/mLの濃度で、S-9 mix非存在下では、1回目は20、30、40 µg/mLで、2回目は10、15、20 µg/mLの濃度で、染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して用いた。

1濃度あたり100×2個の分裂中期像（陽性対照物質は20あるいは25個）について観察した。試験は2回実施し、1回目の試験では男性ドナーの細胞を、2回目の試験では女性ドナーの細胞をそれぞれプールして使用した。

用量設定根拠：

陽性判定基準；溶媒対照と比較して、少なくとも1濃度で再現性を伴う染色体異常細胞数の有意な増加が認められ、かつ、試験施設における背景データよりも多いときに、陽性と判定した。

試験結果：結果を次表に示す。

1回目試験の代謝活性化非存在下で、20 µg/mL及び30 µg/mLの用量において染色体異常細胞数が溶媒対照より軽度増加し、統計学的有意差が認めら

れた。しかし、これら用量群の異常細胞数は背景対照データの範囲内であり、最高用量 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では有意差がみられず、又、溶媒対照における異常細胞数は 0 であった。これらのことから、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量における軽度な増加は染色体異常誘発性を示すものではないと考えられた。その他、統計学的有意差を伴う異常細胞数の増加はみられなかった。

陽性対照として用いた Mitomycin C (MMC) 及び Cyclophosphamide (CP) では、染色体異常を示す分裂中期細胞数の顕著な増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有さないものと判断される。

表 1. 1回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数						有糸分裂指数 ^{b)}	異常細胞出現率 ^{b), c)} (%)		判定	
					染色体分体型			染色体型				他 ^{a)}	+g		-g
					ギャップ	切断	交換	切断	交換						
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	3	100	-	0	0	0	0	0	0	7.5	0.0	0.0	/	
			100		0	0	0	0	0	0	8.8	0.0	0.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	8.2	/	0.0		
検体	20	3	100	-	1	3	0	0	0	0	6.1	4.0	3.0	-	
			100		0	1	0	1	0	0	5.4	2.0	2.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	5.8	/	2.5*		
	30		100		0	2	0	0	0	0	4.5	2.0	2.0		
			100		0	4	0	0	0	0	3.9	4.0	4.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	4.2	/	3.0*		
	40		100		1	3	0	1	0	0	4.7	4.0	3.0		
			100		1	0	0	0	0	0	3.0	1.0	0.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	3.9	/	1.5		
陽性対照 (MMC)	0.5		20		0	6	2	0	0	0	2.4	40.0	40.0	+	
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	3	77	+	0	1	0	2	0	0	7.2	3.9	3.9	/	
			21		0	0	0	0	0	0	8.9	0.0	0.0		
			29		0	0	1	1	0	0	7.9	6.9	6.9		
			69		1	0	0	1	0	0	7.2	2.9	1.45		
			平均		/	/	/	/	/	/	7.8	/	3.06		
検体	20	100	0	0	0	0	0	0	7.0	0.0	0.0	-			
		100	1	1	0	1	0	0	6.2	2.0	1.0				
		平均	/	/	/	/	/	/	6.6	/	0.5				
	30	100	0	1	0	0	0	0	5.8	1.0	1.0				
		100	0	2	0	0	0	0	4.3	2.0	2.0				
		平均	/	/	/	/	/	/	5.1	/	1.5				
	50	100	1	1	0	0	0	0	3.1	2.0	1.0				
100		1	0	0	1	0	0	3.5	2.0	1.0					
平均		/	/	/	/	/	/	3.3	/	1.0					
陽性対照 (CP)	50		25		0	9	1	2	0	0	2.4	48.0	48.0	+	

陽性対照 MMC : Mitomycin C、CP : Cyclophosphamide

Fisher の正確検定 (片側性) * : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

a) : 転位、複合異常

b) : 報告書には有糸分裂指数は小数第 3 位まで、異常細胞出現率は小数第 2 位まで記載されているが、それらの第 2 位及び 3 位の数値は全て 0 であった。

c) : +g ; ギャップを含む。-g ; ギャップを含まない。

表 2. 2 回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数						b) 有糸分裂指数	異常細胞出現率 b),c) (%)		判定	
					染色分体型			染色体型				a) 他	+g		-g
					ギャップ	切断	交換	切断	交換						
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	20	100	-	0	1	0	0	0	0	6.4	1.0	1.0	/	
			100		0	2	0	0	0	0	6.0	2.0	2.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	6.2	/	1.5		
検体	10	20	100	-	0	1	0	1	0	0	5.0	2.0	2.0	-	
			100		1	1	0	0	0	0	4.6	2.0	1.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	4.8	/	1.5		
	15		100		0	8	0	0	0	0	2.9	8.0	8.0		
			100		0	0	0	0	0	0	3.8	0.0	0.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	3.4	/	4.0		
	20		100		0	0	0	0	0	0	2.2	0.0	0.0		
			100		0	2	1	1	0	0	3.3	3.0\$	3.0\$		
			平均		/	/	/	/	/	/	2.8	/	1.5\$		
陽性対照 (MMC)	0.2	25		0	6	0	3	0	0	4.8	36.0	36.0	+		
溶媒対照 (DMSO)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	3	100	+	0	5	0	0	0	0	8.0	5.0	5.0	/	
			100		0	4	0	0	0	0	4.4	4.0	4.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	6.2	/	4.5		
検体	20	3	100	+	1	3	0	0	0	0	7.5	4.0	3.0	-	
			100		0	4	0	0	0	0	7.1	4.0	4.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	7.3	/	3.5		
	30		100		0	4	0	0	0	0	3.0	4.0	4.0		
			100		0	5	0	0	1	0	4.7	6.0	6.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	3.9	/	5.0		
	50		100		0	4	0	0	0	0	2.9	4.0	4.0		
			100		0	7	0	0	0	0	1.8	7.0	7.0		
			平均		/	/	/	/	/	/	2.4	/	5.5		
陽性対照 (CP)	50	25		0	9	0	1	0	0	2.4	40.0	40.0	+		

陽性対照 MMC : Mitomycin C、CP : Cyclophosphamide

Fisher の正確検定 (片側性) ** : $p < 0.01$

a) : 転位、複合異常

b) : 報告書には有糸分裂指数は小数第 3 位まで、異常細胞出現率は小数第 2 位まで記載されているが、それらの第 2 位及び 3 位の数値は全て 0 であった。

c) : +g ; ギャップを含む。 -g ; ギャップを含まない。

\$: 報告書には [+g] 及び [-g] が 3.0%、平均 1.5% と記載されているが、4.0%、平均 2.0% と考える。

表 3. 背景対照データ (染色体異常を有する細胞数) 1996~2005 年

	溶媒対照		陽性対照	
	S-9mix (-)	S-9mix (+)	S-9mix (-)	S-9mix (+)
異常細胞出現割合 (%) の平均 [ギャップを除く]	1.2±1.0 (n=348)	1.1±1.0 (n=314)	37.7±11.9 (n=348)	32.3 ±12.1 (n=314)
異常細胞出現割合 (%) の範囲 [ギャップを除く]	0.0 - 4.5	0.0 - 5.5	9.0 - 88.0	7.0 - 68.0

7) ヒトリンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 No.T-30)

試験機関：

報告書作成年：2008年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：健康なドナー（男女各1名）より採取した末梢血リンパ球細胞を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9 mix）の存在下及び非存在下 3.0~90.5 µg/mL の範囲で染色体異常誘発性を検定した。検体はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して用いた。

所定濃度について 100×2 個の分裂中期像を観察し、試験は2回実施した。

用量設定根拠：

陽性判定基準；溶媒対照と比較して、用量相関を伴う染色体異常細胞数の有意な増加が認められ、かつ、試験施設における背景データよりも多いときに、陽性と判定した。

試験結果：結果を表1および2に示す。また、試験施設における背景対照データを表に示す。

S-9 mix 非存在下の1回目試験、2回目試験及び S-9 mix 存在下の2回目試験では、分裂中期像を観察したすべての濃度において、統計学的有意差を伴う染色体異常細胞数の増加はみられなかった。S-9 mix 存在下の1回目試験では濃度 51.7 及び 90.5 µg/mL においてギャップを除く染色体異常細胞数の割合が軽度増加した（3.0%）。しかし、これは試験実施機関の背景データ範囲内（0.0~3.5%）であり、これらの増加には生物学的意義はないと考えられた。

陽性対照として用いたエチルメタンスルホネート (EMS) 及びシクロホスファミド (CPA) では、染色体異常を示す分裂中期細胞数の顕著な増加が認められた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有さないものと判断される。

表. 背景対照データ (染色体異常を有する細胞数及び割合) 2005~2006年

	溶媒対照		陽性対照	
	S-9mix (-)	S-9mix (+)	S-9mix (-) EMS	S-9mix (+) CPA
異常細胞出現割合 (%) の合計 [ギャップを除く] () は検査した細胞数	1.2 (33600)	1.2 (27800)	13.1 (36800)	12.8 (22600)
異常細胞出現割合 (%) の範囲 [ギャップを除く]	0.0~4.0	0.0~3.5	4.0~42.0	7.5~27.0

表 1. 1回目試験

化合物	濃度 (µg/mL)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数										倍数体細胞の割合 (%)	異常細胞出現率 (%)		判定	
					ギャップ		染色分体型			染色体型				その他		+g (ギャップ)	-g (ギャップ)		
					ギャップ	インギャップ	切断	断片	欠失	交換	同位切断	同位断片	同位欠失	交換					複合異常
溶媒対照 (DMSO)			100	-			1									0.2	1.5	1.5	
			100				2												
			合計				3												
検体	16.9	4	100	-	1		2			3					0.0	3.0	2.0		
			100		1														
			合計		2		2			3									
	29.6	-	100												0.2	0.0	0.0	-	
			100																
			合計																
51.7	-	100	1		1	1								0.2	2.5	1.5			
		100	1		2														
		合計	2		3	1													
陽性対照 (EMS)	880.0	-	100	-	2		8			3		1			0.0	9.5	9.0***	+	
			100		2		9			2	1								
			合計		4		17			5	1	1							
溶媒対照 (DMSO)			100	+			1								0.2	0.5	0.5		
			100																
			合計				1												
検体	29.6	4	100	+											0.0	1.0	1.0		
			100				2												
			合計				2												
	51.7	+	100			1				1					0.0	3.0	3.0*	-	
			100			2				2									
			合計			3			1	2									
90.5	+	100			4									0.4	3.0	3.0*			
		100			2														
		合計			6														
陽性対照 (CPA)	37.5	+	100	+			7	1			1				0.0	12.5	12.5***	+	
			100				10	1		2	5	1							
			合計				17	2		2	6	1							

陽性対照 EMS : エチルメタンサルホネート、CPA : シクロホスファミド +g ; ギャップを含む。 -g ; ギャップを含まない。 空欄は異常細胞数 0 を示す。

Fisher の正確検定 * : p<0.05、*** : p<0.001 [+g] については統計学的計算を実施しなかった。

表2. 2回目試験

化合物	濃度 (µg/mL)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数											倍数体細胞の割合 (%)	異常細胞出現率 (%)		判定	
					ギャップ		染色分体型				染色体型				その他		+g (ギャップ)	-g (ギャップ)		
					ギャップ	インギャップ	切断	断片	欠失	交換	同位切断	同位断片	同位欠失	交換	複合異常					染色体細粉化
溶媒対照 (DMSO)			100	-	2		1										0.2	2.5	1.5	
			100			2														
			合計		2		3													
検体	3.0	22	100	-				1									0.2	0.5	0.5	
			100																	
			合計					1												
			100				2													
			100							1	1									
			合計				2			1	1									
	5.2	22	100	-													0.2	2.0	2.0	
			100																	
			合計																	
			100				2													
			100							1	1									
			合計				2			1	1									
9.1	22	100	-		1	1										0.0	2.0	2.0		
		100																		
		合計		1	1															
		100				1														
		100											1							
		合計		1		1							1							
16.0	22	100	-													0.0	4.0	3.5		
		100																		
		合計																		
		100				4														
		100				5	1													
		合計		1		4	1													
陽性対照 (EMS)	660.0		100	-	1		14	1								0.0	17.5	17.5***	+	
			100								8				2					
			合計		1		29	1			9				4					
溶媒対照 (DMSO)			100	+												0.0	0.5	0.5		
			100												1					
			合計												1					
検体	25.0	4	100	+												0.4	1.5	1.5		
			100																	
			合計																	
	50.0	4	100	+												0.0	0.0	0.0		
			100																	
			合計																	
75.0	4	100	+		1	4									0.0	3.0	2.5			
		100												1						
		合計		1	4									1						
陽性対照 (CPA)	32.5		100	+	2		8				1	1			0.0	11.0	9.0***	+		
			100																	
			合計		2		22			2	2									

陽性対照 EMS : エチルメタンサルホネート、CPA : シクロホスファミド +g ; ギャップを含む。 -g ; ギャップを含まない。 空欄は異常細胞数0を示す。

Fisherの正確検定 * : p<0.05、*** : p<0.001 [+g]については統計学的計算を実施しなかった。

8) ラットを用いた小核試験

(資料 No.T-31)

試験機関：

報告書作成年：2006年

[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：Wistar Hannover ラット (HsdRCCHan) (7~8 週齢、体重 205~264g)、
1 群雄 5 匹

試験方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、0 及び限界用量の 2000 mg/kg を単回強制経口投与した。対照群動物には溶媒を 20mL/kg 投与し、陽性対照群動物にはシクロホスファミドを 20 mg/kg の用量で投与した。投与 24 時間後及び 48 時間後に、溶媒対照群及び検体投与群の動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髓を採取してスライドグラス上で 10 分以上メタノールを用いて固定した。この後、リン酸緩衝液に浸してからアクリジンオレンジ溶液 (0.125 mg/mL) で 1 分間染色した後、新鮮なリン酸緩衝液に浸して骨髓塗抹標本を作製した。陽性対照群の動物は投与 24 時間後に屠殺した。各標本について、細胞毒性を調べるために 1000 個の幼若赤血球 (多染性赤血球) を観察して、全赤血球に対する多染性赤血球の割合を算出後、引き続き 1000 個の多染性赤血球を観察し、小核を有する多染性赤血球数を計測した。

用量設定根拠：

判定基準：溶媒対照群と比較して、小核を有する多染性赤血球数の明らかな増加がみられない、あるいは背景対照データの範囲内にあるときは陰性とした。

小核を有する多染性赤血球数が、溶媒対照群及び背景対照データ範囲の 3 倍以上であるときは陽性と判定した。

小核を有する多染性赤血球数が溶媒対照群より増加したが、溶媒対照群及び背景対照データ範囲の 3 倍未満であるときは、さらに検討を要することとした。

結果：骨髓標本の観察結果および背景対照データを次頁の表に示す。

検体投与群の動物に臨床徴候は観察されず、また、屠殺後の組織にも異常所見はみられなかった。

いずれの標本採取時間においても、溶媒対照群と比較して、小核を有する多染性赤血球の出現頻度は増加しなかった。

陽性対照であるシクロホスファミドでは、溶媒対照群及び背景対照データの範囲と比較して、小核を有する多染性赤血球の出現頻度が 3 倍以上増加した。

以上の結果から、本試験条件下において、検体は骨髓多染性赤血球に小核を誘発せず、染色体異常誘発性は陰性と判断される。

観察結果

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察 動物数	MNPCE (平均値± SD)	PCE/(PCE+NCE) % (平均値±SD)
24 時間	溶媒対照 (0.5%CMC)	—	雄	5	0.7 ± 0.6	61.8 ± 6.7
	検 体	2000	雄	5	1.1 ± 0.7	49.5 ± 5.4
	陽性対照 (シクロホスファミド)	20	雄	5	34.6 ± 12.8	42.1 ± 10.8
48 時間	溶媒対照 (0.5%CMC)	—	雄	5	1.6 ± 1.1	42.7 ± 11.6
	検 体	2000	雄	5	0.8 ± 0.3	35.7 ± 11.8

PCE : 多染性赤血球数

NCE : 正染性赤血球数

MNPCE : 多染性赤血球 1000 個のうち、小核を有する多染性赤血球数

背景対照データの範囲 1996 年 7 月~2003 年 12 月

項 目	溶媒対照 雄		陽性対照 雄
	骨髓採取		骨髓採取
	投与 24 時間後	投与 48 時間後	投与 24 時間後
MNPCE (多染性赤血球 1000 個のうち、 小核を有する多染性赤血球数)	0.85 ± 0.62	0.94 ± 0.96	31.04 ± 10.32
個別別データの範囲	0.0~ 2.5	0.0~ 4.0	8.25~ 56.50
データ数	50	50	50
群平均値の範囲	0.50~ 1.35	0.30~ 2.00	14.00~ 43.20
データ数	10	10	10

9) ラット肝臓を用いる *in vivo/vitro* 不定期 DNA 合成試験

(資料 No.T-32)

試験機関：

報告書作成年：2006 年

[GLP 対応]

検体純度：

供試動物：Wistar Hannover ラット (HsdRCCHan:WIST) (6~7 週齢、体重 177~204g)、
1 群雄 3 匹 (溶媒および陽性対照群は 1 群雄 2 匹)

試験方法：検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に懸濁し、0 及び限界用量の 2000 mg/kg を単回強制経口投与した。投与後 2 時間及び 16 時間に、コラゲナーゼを含む液で肝臓を灌流して肝細胞を採取し、³H-チミジンを加えた培地で培養して、DNA 修復に伴う不定期 DNA 合成が生じた細胞を計測した。

肝細胞を採取した時点ごとに、溶媒対照群 1 匹、検体投与群 3 匹及び陽性対照群 1 匹についてスライド標本を作製してオートラジオグラフィし、顕微鏡で細胞 30×2 個合計 60 個を検査した。各細胞の核内銀粒子数及び核に隣接する細胞質領域の銀粒子数(バックグラウンド)を計測し、前者から後者を差し引いた値を正味の核内銀粒子数として対照群と比較した。

陽性対照には N-ニトロソジメチルアミン(N-DMA)を用い、滅菌脱イオン水に溶解して 10 mg/kg を投与した。

すべての検体投与動物について、正味の平均核内銀粒子数が 0 より低い場合、陰性と判断した。

用量設定根拠：

試験結果：結果の総括および背景対照データを次頁に示す。

培養した肝細胞の生存率は 50~81.6%で、過度の細胞毒性はみられず、本試験が実施された。いずれの細胞採取時点においても検体を投与した動物の肝細胞における正味核内銀粒子数の平均は 0 より低く、修復細胞の割合は、溶媒対照群と比較して有意な増加を示さなかった。

一方、陽性対照の N-DMA 投与動物では、正味の核内銀粒子数及び修復細胞の割合が著しく増加した。

以上の結果より、検体は、本試験条件下で、DNA 修復合成を示さず、DNA 損傷性を有さないものと判断される。

表. 結果の総括

肝細胞採取時期	薬物	投与量 (mg/kg)	検査動物数 (細胞数)	平均核内銀粒子数	平均細胞質領域銀粒子数	平均正味銀粒子数	修復細胞の割合平均 (%)
投与後 2 時間	溶媒対照 (CMC)	—	1 (60)	3.18	8.20	— 5.02	0
	検体	2000	3 (60×3)	2.76 ±0.58	7.99 ±1.09	— 5.23 ±0.54	1
	陽性対照 (N-DMA)	10	1 (60)	24.17	8.43	15.73	80
投与後 16 時間	溶媒対照 (CMC)	—	1 (60)	2.45	4.65	— 2.20	0
	検体	2000	3 (60×3)	4.03 ±0.91	7.58 ±0.48	— 3.55 ±0.47	0
	陽性対照 (N-DMA)	10	1 (60)	14.27	6.33	7.93	73

N-DMA: N-ニトロソジメチルアミン

背景対照データ

薬物	検査標本数	平均値及び範囲			
		核内銀粒子数	細胞質領域銀粒子数	正味銀粒子数	修復細胞の割合 (%)
溶媒対照	80	6.91 ± 2.65	11.23 ± 4.08	— 4.33 ± 1.67	0.5 ± 0.9
		1.70~13.70	2.70~22.70	— 1.00~— 10.00	0~3.0
陽性対照	75	19.80 ± 6.42	9.85 ± 4.41	11.14 ± 32.0	73.8 ± 10.2
		8.40~32.70	2.30~21.60	4.70~98.50	52.0~97.0

(10) 生体機能影響

1) ラットを用いた状態観察 (Irwin 変法)

(資料 No.T-48)

試験機関:

報告書作成年: 2012 年

[GLP 対応]

検体の純度:

供試動物 : Wistar Hannover ラット (RccHanTM:WIST)、雄、投与時 8 週齢、
体重 ; 239.5~269.0 g、1 群各 6 匹

投与方法 : 投与用量として 0、30、250 および 2000 mg/kg の 4 用量を設定した。検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、高用量群は 20 mL/kg 体重の容量で強制経口投与した。低・中用量群については 10 mL/kg 体重の容量で強制経口投与した後、10 mL/kg 体重の容量で溶媒を与えた。投与前の絶食は行わなかった。

用量設定根拠:

観察・検査項目 : 投与前および投与後 1、2、4、6 時間に、Irwin 変法に従い観察した。

結果 : いずれの用量においても毒性学的に有意な影響は認められなかった。

対照群と比較して僅かに運動量低下の一過性の増加が認められたが、一貫した投与との関連性は認められなかった。運動量増加も認められたが、明確な用量相関性を示さず、また対照群においても認められたことから、被験物質投与とは無関係と考えられた。2000 mg/kg 群の 1 匹で怯えが認められたが、低頻度の発現であったことから、偶発的所見と考えられた。

検体を 30、250 および 2000 mg/kg の用量で雄ラットに単回強制経口投与し、Irwin 変法に従い観察した結果、毒性学的に有意な影響は認められなかった。

本試験の無毒性量は 2000 mg/kg であった。

2) ラットを用いた循環器系および呼吸器系への影響試験

(資料 No.T-49)

試験機関:

報告書作成年: 2012 年

[GLP 対応]

検体の純度:

供試動物 : Wistar Hannover ラット (RccHanTM:WIST)、雄、投与時 8 週齢、
体重 ; 230~272 g、1 群各 4 匹

投与方法 : 投与用量として 0、30、250 および 2000 mg/kg の 4 用量を設定した。検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、20 mL/kg 体重の容量でウレタン麻酔下のラットの十二指腸に投与した。投与前の絶食は行わなかった。

用量設定根拠:

観察・検査項目: 投与前および投与後 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、90、120、150、180 分の循環器系パラメータ (収縮期/拡張期/平均血圧、心拍数) および呼吸器系パラメータ (呼吸数、1 回換気量、分時換気量) を測定し、心電図を記録した。

結果 : 循環器系

2000 mg/kg 群では、投与 35 分から 90 分までの収縮期、拡張期および平均血圧が低下した。

統計学的に有意な心拍数および P 波幅の変化が散見されたが、軽微な変化であり、その殆どが背景データの範囲内あるいは投与前の値と同様であり、またいずれの動物の心電図にも視覚的影響が認められなかったことから、明らかに被験物質投与と関連する変化とは考えられなかった。

250 および 30 mg/kg 群の循環器系に投与の影響は認められなかった。

対照群と比較して統計学的に有意な P 波幅の低下が 250 mg/kg 群で認められたが、これは開始前の値を反映したものであり、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

呼吸器系

2000 mg/kg 群では、投与 25 分から絶対呼吸数の減少傾向が認められたが、開始前の値が対照群と比較して高く、統計学的有意ないずれの差も概ね対照群の値の範囲内であったことから、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

250 および 30 mg/kg 群の呼吸器系に投与の影響は認められなかった。

いくつかの項目で対照群と比較して統計学的に有意な変化が散見されたが、開始前の値を反映したものであること、あるいは用量との相関が認められないことなどから、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

検体を 30、250 および 2000 mg/kg の用量で雄ラットに単回十二指腸投与した結果、2000 mg/kg 群で血圧に影響が認められた。

250 および 30 mg/kg 群では影響が認められず、本試験の無毒性量は 250 mg/kg であった。

3) ラットを用いた腎機能影響試験

(資料 No.T-50)

試験機関：

報告書作成年：2012年

[GLP 対応]

検体の純度：

供試動物：Wistar Hannover ラット (RccHanTM:WIST)、雄、投与時 8 週齢、
体重；240.2～272.9 g、1 群各 6 匹

投与方法：投与用量として 0、30、250 および 2000 mg/kg の 4 用量を設定した。検体を 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁し、高用量群は 20 mL/kg 体重の容量で強制経口投与した。低・中用量群については、10 mL/kg 体重の容量で強制経口投与した後、10 mL/kg 体重の容量で溶媒を与えた。投与前の絶食は行わなかった。

用量設定根拠；

観察・検査項目：投与後 0-6 時間および 6-24 時間の試料を用いて尿検査を実施し、投与 24 時間後に舌下静脈から採血しクレアチニン濃度を測定した。

結果：尿検査

2000 mg/kg 群における主要な変動を次表に示す。

項目	0-6 時間	6-24 時間
尿量	-25	-38
浸透圧	+11	+75↑
pH	0	-10↓
クレアチニン	+18	+44
蛋白	-8	+180
Na	-18	+105
K	0	+75
Cl	-36	+163↑
Ca	-57	+69
P	-914	+121

統計学的有意差：↑↓：p<0.05 (Dunnnett または Steel 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

投与後 0-6 時間の試料に、統計学的に有意な影響は認められなかった。

投与後 6-24 時間の試料では、電解質の増加が認められ、Cl の変動は統計学的に有意であった。これに伴い、浸透圧の有意な上昇も認められた。同様に、クレアチニンおよび蛋白も増加した。一方、pH は有意に低下した。

250 および 30 mg/kg 群では、影響は認められなかった。

クレアチンクリアランス

影響は認められなかった。

検体を 30、250 および 2000 mg/kg の用量で雄ラットに単回強制経口投与し、腎機能への影響を観察した結果、2000 mg/kg 群では投与 24 時間後に尿の電解質、浸透圧、クレアチニンおよび蛋白濃度の上昇等、尿成分に変化が認められた。クレアチンクリアランスに影響は認められなかった。本試験の無毒性量は 250 mg/kg であった。

[生体の機能に及ぼす影響に関する試験] の総括表

試験項目	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹/群)	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般症状 [Irwin 法] (ラット)	経口 (0.5%CMC)	0 30 250 2000	雄 6	-	2000	影響なし
呼吸・循環器系 呼吸数 血圧 心拍数 心電図 (ラット)	十二指腸 (0.5%CMC)	0 30 250 2000	雄 4	2000	250	血圧低下
腎機能 尿検査 クレアチンクリアランス (ラット)	経口 (0.5%CMC)	0 30 250 2000	雄 6	2000	250	電解質、浸透圧、ク レアチニンおよび蛋 白濃度の上昇 クレアチンクリア ランスに影響なし

CMC : カルボキシメチルセルロース水溶液

11) その他

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

11-1)

1)

(資料 No.T-33)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

2)

(資料 No.T-34)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

3)

(資料 No.T-35)

- 1 -

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

- ()

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

11-2)

1)

(資料 No.T-36)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

2)

(資料 No.T-37)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はシンジェンタジャパン株式会社及び日産化学工業株式会社にある。

2. 代謝分解物の毒性

以下の代謝分解物について、ラットにおける急性経口毒性試験、28日間反復経口投与毒性試験、細菌を用いた復帰突然変異試験、遺伝子突然変異試験および *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

記号	一般名または略称	化学名	構造式	由来

- (1) 代謝物 の毒性試験
1) 代謝物 のラットにおける急性経口毒性試験 (資料No.T-38)

試験機関：
報告書作成年：2008年 [GLP対応]

検体の純度：

供試動物：Wistar Hannoverラット (HanRcc:WIST)、9~12週齢、体重153.5~212.2g
一群雌5匹

観察期間：14日間

試験方法：上げ下げ法

投与方法：0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)水溶液に検体を懸濁して経口投与した。投与前17~18時間及び投与後3~4時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。観察期間中の死亡動物及び試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を実施した。

結 果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現時間及び消失時間	投与後1時間から発現 投与後4日に消失
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状として投与後1時間から立毛、鎮静状態及び円背位が観察された。いずれの動物も、観察期間終了時の体重は投与時より増加した。剖検所見では特記すべき変化は認められなかった。

2) のラットを用いた飼料混入投与による 28 日間反復経口投与毒性
試験 (資料 No.T-39)

試験機関:

報告書作成年: 2008 年

[GLP 対応]

検体の純度:

供試動物 : Wistar Hannover ラット (CrI:WI (Han)) ラット、投与開始時約 7 週齢、体重; 雄 204
~223 g、雌 138~166g、1 群雌雄各 5 匹

投与期間 : 28 日間 (2008 年 2 月 12 日~2008 年 3 月 11 日)

投与方法 : 検体を 0、2000、6000 および 12000 ppm の濃度で飼料に混和し、28 日間にわたって
摂食させた。

用量設定根拠:

観察・検査項目および結果:

一般状態および死亡率; 死亡および瀕死について毎日午前、午後の 2 回観察した。一般状態に
ついては詳細な症状観察日を除き毎日 1 回観察した。詳細な症状観察は、投与開始
前 2 回およびその後は週 1 回行った。

いずれの投与群の雌雄でも死亡例はなく、投与に関連した一般状態の変化は認めら
れなかった。

体重変化; 投与開始前に 2 回、投与 1~8 日は毎日およびその後は週 2 回、全動物の体重を測定
した。

対照群と比べ統計学的有意差または傾向の認められた検査時期を表 1 に示す。

体重については、いずれの投与群の雌雄においても検体投与の影響はなかった。

各投与群の体重増加量において統計学的に有意な変化が認められたが、偶発性変化であり、検体投与との関連性はないと判断された。

表 1. 体重増加量 (g)

性別	雄				雌			
	0	2000	6000	12000	0	2000	6000	12000
投与量 (ppm)								
1 日					1 ^{a)}	5↑↑	5↑	4 ^{a)}
5 日					9 ^{a)}	18↑↑	16↑	13 ^{a)}
10 日	64 ^{a)}	53↓	56 ^{a)}	58 ^{a)}				
17 日					34 ^{a)}	41 ^{a)}	43↑	42 ^{a)}

統計学的有意差：↑↓：p<0.05、↑↑：p<0.01 (Dunnett 検定)

表中の数字は実測値 (g)

a)：有意差はないが、参考のために記載した。

摂餌量；全動物の摂餌量を試験開始前に 2 回、投与開始から 1 週間では毎日およびその後は週 2 回測定した。

摂餌量について対照群と比べ統計学的有意差の認められた検査時期を表 2 に示す。6000 ppm 群の雄において摂餌量について統計学的に有意な変化が認められたが、いずれも偶発性変化であり、検体投与との関連性はないと判断された。

表 2. 摂餌量

性別	雄			雌		
	2000	6000	12000	2000	6000	12000
投与量 (ppm)						
6-7 日		88↓				
7-10 日		88↓↓				
21-24 日		91↓				
24-27 日		92↓				

統計学的有意差：↓：p<0.05、↓↓：p<0.01 (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

検体摂取量；投与期間中の平均検体摂取量は表3のとおりであった。

表3. 検体摂取量

投与量 (ppm)		2000	6000	12000
検体摂取量 (mg/kg/日)	雄	175	497	1018
	雌	176	525	1107

機能観察総合検査（詳細な状態の観察および機能検査）；投与3週に全動物を対象として、以下の項目を観察・測定した。

ホームケージ内の観察

姿勢

痙攣/振戦

糞の状態

ハンドリングによる観察

ケージからの取り出しやすさ

流涎/色素涙

立毛

眼瞼閉鎖

眼球突出

赤色/痂皮様沈着物

オープンフィールド内の観察

運動性

立ち上がり

痙攣/振戦

身づくろい

異常/常同行動

第一歩までの時間 (秒)

感覚の観察

接近反応

驚愕反応

瞳孔反応

前肢の伸展

空中立ち直り反射

神経筋の観察

後肢伸筋強度

後肢開脚幅

生理学的観察

カタレプシー

体温

自発運動量

咬みつき

眼瞼閉鎖

取り扱いやすさ

流涎

被毛の状態

呼吸速度/特徴

粘膜/眼/皮膚色

筋緊張

歩行

覚醒

排尿/排便

歩行尺度

後ずさり

触覚反応

痛覚反応

瞬目反応

後肢の伸展

嗅覚性方向反応

前後肢握力

ロータロッドによる測定

体重

投与3週に全動物を対象として、自動測定装置を用いて自発運動量（5分単位で60分間）を測定し、10分間隔に取りまとめた。

いずれの検査項目において、いずれの投与群の雌雄でも統計学的に有意な変化はみられなかった。

なお、その他機能観察総合検査における詳細な状態の観察および機能検査項目には、いずれの投与群の雌雄でも投与による影響は認められなかった。

表 4. 詳細な状態の観察

性別	雄				雌			
	0	2000	6000	12000	0	2000	6000	12000
投与量 (ppm)	0	2000	6000	12000	0	2000	6000	12000
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
排糞数	0.0	2.0 [↑]	1.0	0.8	0.0	0.8	0.0	0.4

統計学的有意差：[↑]：p<0.05 (Dunnett 検定)

血液学的検査；投与終了後に一晩絶食後の全動物を対象として、後眼窩静脈叢（血液学的検査用）または大静脈（凝固パラメーター検査用）から血液を採取し、以下の項目を観察・測定した。

総白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、血小板数、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、網状赤血球 (比率および絶対数)、白血球分類 [(百分比および絶対数)、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、大型未分類細胞]、血球形態

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を表 5 に示す。

網状赤血球数および網状赤血球 (百分比) の減少が 12000 および 6000 ppm 群の雄において認められた。網状赤血球数の変化は投与量との関連性はなく、かつ、これらの投与群の赤血球における変化と関連していないことおよび当研究所における背景データの範囲内であったことから、検体投与とは関連性のない偶発性変化であると考えられた。

上記以外にもいくつかの検査項目において統計学的に有意な変動がみられたが、いずれも投与量との関連性がないことから、検体投与との関連性はないと判断された。

表 5. 血液学的検査

性別	雄			雌		
	2000	6000	12000	2000	6000	12000
投与量 (ppm)	2000	6000	12000	2000	6000	12000
ヘモグロビン				109↑		
MCH		108↑				
MCHC		105↑				
網状赤血球数		74↓ (133.3)	78↓ (140.4)			
網状赤血球(百分比)		81↓	76↓			
白血球数				153↑		
リンパ球数				173↑		

統計学的有意差：↑↓：p<0.05 (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの。

() 内の数値は測定値

血液生化学的検査；投与終了後に一晚絶食後の全動物を対象として、後眼窩静脈洞から血液を採取し、得られた血漿を用いて以下の項目を測定した。

アルブミン、総蛋白、グロブリン、アルブミン/グロブリン比、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、アルカリホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、グルコース、総コレステロール、カルシウム、クロール、リン、カリウム、ナトリウム、トリグリセリド

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を表 6 に示す。

ALP の減少が 12000 および 6000 ppm 群の雄において認められたが、投与量との関連性はなく、かつ当研究所における背景データの範囲内であったことから、検体投与とは関連性のない偶発性変化であると考えられた。6000 ppm 群の雌において尿素窒素が有意に増加したが、投与量との関連性はないことから検体投与との関連性はないと考えられた。

表 6. 血液生化学的検査

性別	雄			雌		
	2000	6000	12000	2000	6000	12000
投与量 (ppm)						
ALP		72↓ (114)	73↓ (116)			
尿素窒素					126↑↑	

統計学的有意差：↓：p<0.05、↑↑：p<0.01 (Dunnett 検定)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

() 内の数値は測定値

肝臓の生化学的検査；投与終了後に全動物を対象として、肝臓のミクロソーム画分を調製し、チトクロム P450 含量および 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) ならびに 7-pentoxoresorufin O-deethylase (PROD) 活性を測定した。

いずれの投与群の雌雄でも統計学的に有意な変化は観察されず、検体投与に関連した影響はなかった。

尿検査；投与終了前に全動物を対象として、代謝ケージを用いて尿を採取し、以下の項目を観察・測定した。

比重、pH、ウロビリノーゲン、総尿量、色調、透明度、蛋白、糖、ケトン、ビリルビン、潜血、白血球、亜硝酸塩、尿沈渣顕微鏡検査

いずれの投与群の雌雄でも統計学的に有意な変化は観察されず、検体投与に関連した影響はなかった。

眼科学的検査；投与開始前および投与 3 週に全動物を対象として検査した。

雌雄とも検体投与に関連した異常は認められなかった。

臓器重量；投与終了後に全動物を対象として、以下の臓器重量を測定した。

なお、両側の臓器は合わせて秤量した。

副腎 (両側)、脳、精巣上体 (両側)、心臓、腎臓 (両側)、肝臓、卵巣 (両側)、脾臓、精巣 (両側)、胸腺、子宮および子宮頸部

対照群と比べ統計学的有意差の認められた項目を表 7 に示す。

12000 ppm 群の雄で腎臓の絶対重量が減少したが、病理組織学的検査あるいは血液生化学的検査において異常はないことから、検体投与との関連性はない偶発性変化であると判断された。

また、6000 ppm 群の雌で子宮・子宮頸部の絶対重量が減少したが、投与量との関連性はなく、検体投与との関連性はないと判断された。

表 7. 臓器重量

性別		雄			雌		
投与量 (ppm)		2000	6000	12000	2000	6000	12000
最終体重							
腎臓	絶対重量			88↓			
	対体重比			91 ^{a)}			
子宮・ 子宮頸部	絶対重量					59↓	
	対体重比					59↓	

統計学的有意差：↓：p<0.05 (Dunnett 検定、対体重比は申請者実施)

表中の数値は変動の目安として対照群を 100 とした場合の値を示したもの

a)：有意差はないが、参考のために記載した

肉眼的病理検査；投与終了後に全動物を対象として肉眼的病理検査を行った。

いずれの投与群の雌雄でも投与に関連した変化は認められなかった。

病理組織学的検査；投与終了後に対照群および 12000 ppm 群の全動物を対象として、以下の組織について病理標本を作製し、検鏡した。また 2000 ppm および 6000 ppm 群の肉眼的病変の認められた組織についても検鏡した。

副腎（両側）、骨・骨髄（胸骨・大腿骨）、脳（大脳、小脳（延髄/橋を含む））、子宮頸部、精巣上部（両側）、消化管（胃、十二指腸、空腸（パイエル板を含む）、回腸、盲腸、結腸、直腸）、心臓、腎臓（両側）、肝臓、肺（両側、気管支を含む）、リンパ節（顎下、腸間膜）、卵巣（両側、卵管を含む）、坐骨神経、前立腺、精囊（両側）、脊髄（頸部、胸部、腰部）脾臓、精巣（両側）、胸腺、甲状腺（上皮小体を含む）、気管、膀胱、子宮・膣、肉眼的異常部位

認められたすべての病理組織学的所見を表 8 に示す。

いずれの投与群の雌雄でも投与に関連した変化は認められなかった。

以上の結果から、代謝物をラットに 12000、6000 および 2000 ppm の用量で 28 日間飼料混入投与した結果、いずれの投与群の雌雄ともに明らかな毒性影響は認められなかった。したがって、無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 12000 ppm (雄；1018 mg/kg/日、雌；1107 mg/kg/日) と判断された。

表 8. 病理組織学的検査所見

性 別		雄				雌			
投与量 (ppm)		0	2000	6000	12000	0	2000	6000	12000
検査動物数		5	2	2	5	5	3	0	5
腎 臓	所見\検査動物数	5	-	-	5	5	1	-	5
	好塩基性尿細管	0	-	-	1	0	0	-	0
	腎盂拡張	1	-	-	0	0	0	-	1
	亜急性炎症	0	-	-	0	1	0	-	0
肝 臓	所見\検査動物数	5	-	-	5	5	-	-	5
	各種炎症性細胞浸潤	4	-	-	4	3	-	-	3
	肝細胞空胞化	0	-	-	0	1	-	-	0
顎下 リンパ節	所見\検査動物数	5	-	1	5	5	-	-	5
	出血	0	-	1	1	1	-	-	0
	リンパ球系細胞過形成	0	-	0	1	0	-	-	1
	形質細胞増加、髄質	2	-	1	3	2	-	-	1
胸 腺	所見\検査動物数	5	2	1	5	5	2	-	5
	出血	2	2	1	3	0	1	-	0
子 宮	所見\検査動物数					5	-	-	5
	内腔拡張					3	-	-	1

統計学的有意差： Mann-Whitney の U 検定 (有意差なし)

3) 代謝物 の細菌を用いた復帰突然変異試験 (資料 No.T-40)

試験機関:

報告書作成年: 2008 年

[GLP 対応]

検体純度:

試験方法: ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* [TA98、TA100、TA1535、TA1537 株] 及びトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* [WP2 (pKM101)、WP2 *uvrA* (pKM101) 株] を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の存在下及び非存在下で Ames らの方法を用いて変異原性を検定した。検体は DMSO に溶解し、1 回目はプレート法で 3~5000 µg/プレートの範囲の 8 濃度、2 回目はプレインキュベーション法で 33~5000 µg/プレートの範囲の 6 濃度で試験した。試験は 3 連制とした。

用量設定根拠:

判定基準; 検体処理群における復帰変異コロニー数が溶媒対照の 2 倍以上増加し、かつ用量相関性がみられた場合に陽性と判定した。ただし、用量相関性を伴う復帰変異コロニー数の増加が 1 濃度のみの場合には、2 回目の試験で再現性を確認し、かつ試験施設における無処理対照および溶媒対照の背景データよりも大きい場合に陽性と判定した。

試験結果: 結果を表に示す。

2 回の試験において検体は S-9 mix の有無にかかわらず、最高濃度 5000 µg/プレートまでの濃度で、いずれの菌株についても生育の阻害はみられず、また、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

一方、陽性対照として用いた Sodium azide(NaN_3)、4-nitro-o-phenylene-diamine (4-NOPD)、Methyl methanesulfonate(MMS) 及び 2-Aminoanthracene(2-AA)では、すべての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、代謝物 は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性は有さないものと判断される。

表 1. 1回目試験の結果(数値は3反復の平均値) プレート法

化合物	濃度 ($\mu\text{g}/7^\circ\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	106	11	228	305	19	12	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	116	13	226	323	19	15	
検体	3	-	102	11	207	316	18	11	
	10	-	94	12	226	297	19	14	
	33	-	95	14	219	276	26	17	
	100	-	99	15	211	323	24	12	
	333	-	99	14	208	294	21	15	
	1000	-	111	14	222	315	20	14	
	2500	-	101	14	223	322	21	12	
	5000	-	115	14	224	343	24	14	
陽性 対 照	NaN ₃	10	-	2095	1835	-	-	-	-
	4-NOPD	10	-	-	-	-	-	332	-
		50	-	-	-	-	-	-	92
	MMS	3.0 μL	-	-	-	4001	3882	-	-
無処理対照	0	+	102	14	276	347	39	16	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	122	14	230	360	32	16	
検体	3	+	106	14	260	369	32	20	
	10	+	114	12	250	341	33	20	
	33	+	121	16	265	316	31	16	
	100	+	126	17	255	324	29	19	
	333	+	103	15	241	379	31	18	
	1000	+	105	14	234	345	32	21	
	2500	+	110	13	190	323	31	20	
	5000	+	115	17	252	333	31	22	
陽性 対 照	2-AA	2.5	+	1420	203	-	-	948	119
		10.0	+	-	-	3848	2050	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide

4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine

MMS : methyl methanesulfonate

2-AA : 2-Aminoanthracene

表 2. 2 回目試験の結果(数値は 3 反復の平均値) プレインキュベーション法

化合物	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S-9 mix	復帰変異コロニー数/プレート						
			塩基対置換型				フレームシフト型		
			TA 100	TA 1535	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101	TA 98	TA 1537	
無処理対照	0	-	190	18	270	369	26	18	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	184	16	246	325	28	14	
検体	33	-	180	18	245	325	26	13	
	100	-	191	15	261	318	28	13	
	333	-	191	18	226	321	28	12	
	1000	-	200	17	251	338	27	14	
	2500	-	213	13	235	335	27	16	
	5000	-	199	16	241	367	29	15	
陽性 対 照	NaN ₃	10	-	1795	2024	-	-	-	-
	4-NOPD	10	-	-	-	-	-	361	-
		50	-	-	-	-	-	-	135
	MMS	3.0 μL	-	-	-	2511	1369	-	-
無処理対照	0	+	201	16	319	401	36	17	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	190	14	273	379	32	13	
検体	33	+	161	15	268	380	37	15	
	100	+	154	14	253	353	32	17	
	333	+	150	14	272	389	35	16	
	1000	+	148	15	276	403	34	13	
	2500	+	143	14	275	404	34	15	
	5000	+	149	15	220	401	33	14	
陽性 対 照	2-AA	2.5	+	1240	260	-	-	1093	176
		10	+	-	-	1989	2524	-	-

陽性対照 NaN₃ : Sodium azide

4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine

MMS : methyl methanesulfonate

2-AA : 2-Aminoanthracene

4) 代謝物
試験

のマウスリンホーマ細胞を用いる遺伝子突然変異
(資料 No.T-41)

試験機関：

報告書作成年：2008 年

[GLP 対応]

検体純度：

試験方法：マウスリンホーマ細胞 L5178Y *tk^{+/-}*を用いた TK 試験により、検体の TK 遺伝子における突然変異誘発性及び染色体異常誘発性を、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の存在下及び非存在下で検定した。

検体は脱イオン水に溶解し、S-9 mix 非存在下及び存在下で濃度 110.0~1760 µg/mL の用量範囲とし、4 時間処理後における相対クローニング効率、細胞増殖抑制率及び変異頻度を測定した。

試験は 2 連(培養区 I 及び II)で 2 回実施した。

用量設定根拠；

判定基準；溶媒対照と比較して、用量依存的な変異頻度の増加に再現性がみられ、かつ溶媒対照及び無処理対照の閾値を越える場合に陽性と判定した。

試験結果：結果の概要を次表に示す。

1 回目試験の S-9 mix 非存在下及び存在下で、各濃度における細胞 10^6 個当りの変異頻度に、用量に関連した増加はみられなかった。

2 回目試験では S-9 mix 非存在下の変異頻度はすべての濃度で閾値を超えなかったが、存在下では濃度 1760 µg/mL の培養区 I において、細胞 10^6 個当りの変異頻度が 288 となり、閾値の 209 を超え、また、用量に対する変異頻度の直線回帰(最小二乗法)に有意差($p < 0.05$)が認められた。しかし、培養区 II の 1760 µg/mL における変異頻度は 110 であり、培養区 I と II の平均は 199 で、閾値の 221 を超えず、培養区 I の変異頻度は偶発的な値と考えられた。

一方、陽性対照として用いたメチルメタンシルホネート(MMS)およびシクロホスファミド(CPA)では、変異頻度の明らかな増加が認められた。

以上の結果から、代謝物 は代謝活性化を含む本試験条件下で遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性は有さないものと判断される。

変異頻度の背景対照データ 処理時間 4 時間 2005 - 2006 年実施試験

群	変異頻度/10 ⁶ (平均値±標準偏差及びデータの範囲[])	
	S-9mix(-)	S-9mix(+)
無処理対照	91 ± 36 [41 - 210]	89 ± 39 [40 - 209]
溶媒対照	92 ± 40 [40 - 204]	85 ± 34 [40 - 203]
陽性対照	(メチルメタンサルホネート) 398 ± 182 [202 - 1582]	(シクロホスファミド) 385 ± 183 [209 - 1269]

表. 本試験結果の概要

試験回	処理時間：4時間		培養区Ⅰ				培養区Ⅱ						
	薬物及び濃度(μg/mL)	S-9 mixの有無	(1) 相対クロニング効率1	(2) 最終相対増殖率	(3) 変異頻度/10 ⁶	(4) 閾値	(1) 相対クロニング効率1	(2) 最終相対増殖率	(3) 変異頻度/10 ⁶	(4) 閾値			
1回目 4時間処理	無処理対照	-	100.0	100.0	64	188	100.0	100.0	85	217			
	溶媒対照(脱イソ水)	-	100.0	100.0	62		100.0	100.0	91				
	検体	110.0	-	81.8	36.3		131	108.1	93.0		96		
		220.0	-	109.3	97.6		44	79.0	109.2		80		
		440.0	-	85.4	72.7		81	98.5	77.8		121		
		880.0	-	79.5	73.6		77	104.8	79.8		91		
		1760.0	-	107.7	43.0		165	98.5	68.1		107		
	陽性対照(MMS)	19.5	-	44.7	3.9		605	54.3	28.9		361		
	無処理対照	+	100.0	100.0	66		195	100.0	100.0		107	228	
	溶媒対照(脱イソ水)	+	100.0	100.0	69			100.0	100.0		102		
	検体	110.0	+	76.0	69.5			77	82.3		133.4		86
		220.0	+	53.7	50.0			85	103.2		77.3		85
		440.0	+	39.8	31.2			111	73.4		61.1		100
		880.0	+	30.1	22.2			115	39.1		32.9		137
1760.0		+	40.4	32.5	98	89.9		123.9	98				
陽性対照(CPA)	3.0	+	67.1	49.8	161	71.4		57.8	186				
	4.5	+	23.7	11.4	459	34.3		47.0	248				
2回目 4時間処理	無処理対照	-	100.0	100.0	95	225		100.0	100.0	119	192		
	溶媒対照(脱イソ水)	-	100.0	100.0	99			100.0	100.0	66			
	検体	110.0	-	118.0	100.6			96	127.5	75.9			107
		220.0	-	95.4	65.1			115	114.2	55.8			145
		440.0	-	150.5	104.0			91	114.2	59.4			111
		880.0	-	85.8	61.4		104	96.9	77.4	77			
		1760.0	-	84.1	72.7		97	83.3	58.7	153			
	陽性対照(MMS)	19.5	-	55.2	27.0		300	86.9	19.2	343			
	無処理対照	+	100.0	100.0	110		209	100.0	100.0	121		233	
	溶媒対照(脱イソ水)	+	100.0	100.0	83			100.0	100.0	107			
	検体	110.0	+	85.8	74.8			143	177.7	85.6			96
		220.0	+	71.0	36.9			172	95.5	56.1			134
		440.0	+	62.5	43.1			123	84.9	47.2			134
		880.0	+	51.2	32.0			132	74.6	26.9			153
1760.0		+	41.6	13.9	288	69.5		46.9	110				
陽性対照(CPA)	3.0	+	76.9	0.0	nd	83.7		55.3	212				
	4.5	+	59.4	32.7	479	71.5		39.0	267				

(1)~(4)の計算方法を下記に示す。

- クロニング効率(播種効率)1 = $-\ln[96\text{wellプレート}2\text{枚中のコロニーが生じていないwell数の合計}/(96 \times 2)] / (\text{well当りの播種細胞数})$
相対クロニング効率1 = 対応する対照群のクロニング効率1を100とした場合の値。
- クロニング効率2 = $-\ln[\text{コロニーが生じないwell数の平均}/96] / (\text{well当りの播種細胞数})$
相対クロニング効率2 = 対応する対照群のクロニング効率2を100とした場合の値。
最終相対増殖率 = (相対増殖率 × 相対クロニング効率2) / 100
- 変異頻度 = 細胞 10⁶ 個当りの突然変異小コロニー数 + 突然変異大コロニー数
- 閾値 = [溶媒対照における細胞 10⁶ 個当りの突然変異コロニー数] + 126

MMS : メチルメタンサルホネート CPA : シクロホスファミド nd : 測定不能

5) 代謝物
試験

のヒトリリンパ球細胞を用いた *in vitro* 染色体異常
(資料 No.T-42)

試験機関:

報告書作成年: 2008 年

[GLP 対応]

検体純度:

試験方法: 健康なドナー (女性 1 名) より採取した末梢血リンパ球細胞を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系(S-9 mix)の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検定した。検体は脱イオン水に溶解して用い、S-9 mix 非存在下では 574.7~1760.0 µg/mL の範囲、存在下では 328.4~1005.7(1 回目)または 574.7~1760.0 µg/mL(2 回目)の範囲で染色体異常誘発性を検定した。各濃度について 100×2 個の分裂中期像を観察し、試験は 2 回実施した。

用量設定根拠:

判定基準: 溶媒対照と比較して、用量相関を伴う染色体異常細胞数の有意な増加が認められ、かつ、試験施設における背景データよりも多いときに、陽性と判定した。

試験結果: 結果を表 1 及び 2 に示す。

染色体異常細胞数 (ギャップを除く) は 1760.0 µg/mL 処理群において、本試験 2 回目の S-9 mix 存在下で 2.5%、574.7 µg/mL 処理群において、本試験 1 回目の S-9 mix 非存在下で 2.0% であり、それぞれ溶媒対照処理群と比較して有意な増加が認められた。しかし、この値は試験施設における背景データの範囲内 (S-9mix 非存在下 0.0 - 4.0 %、S-9 mix 存在下 0.0-3.5%) であり、検体投与による影響ではないと考えられた。

従って、検体は代謝活性化の有無にかかわらず、観察したすべての処理群で、染色体異常を示す分裂中期細胞数の増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いたエチルメタンスルホネート(EMS)及びシクロホスファミド(CPA)では、染色体異常を示す分裂中期細胞数の明らかな増加を示した。

以上の結果より、代謝物は代謝活性化を含む本試験条件下において染色体異常誘発性は有さないものと判断される。

表. 背景対照データ(染色体異常を有する細胞数及び割合) 2005~2006年

供試細胞： ヒト末梢血リンパ球細胞	溶媒対照			
	ギャップを含む		ギャップを除く	
	S-9Mix(-)	S-9Mix(+)	S-9Mix(-)	S-9Mix(+)
異常細胞出現割合(%)の平均	1.6	1.5	1.2	1.2
異常細胞出現割合(%)の範囲	0.0~5.0	0.0~4.5	0.0~4.0	0.0~3.5

表1. 1回目試験

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数											倍数体細胞の割合 (%)	異常細胞出現率 (%)		判定	
					ギャップ		染色分体型				染色体型				他		+g (ギャップ)	-g (ギャップ)		
					ギャップ	インギャップ	切断	断片	欠失	交換	同位切断	同位断片	同位欠失	交換	複合異常					染色体細粉化
溶媒対照 (脱イソ水)	10% (v/v)	4	100	-	1											0.0	1.0	0.0	/	
			100		1															
			合計		2															
検体	574.7	4	100	-	1		1								0.0	2.5	2.0*	-		
			100		1	1				1										
	合計	1	2	1				1												
	1005.7	4	100	-			1	1							0.2	1.0	1.0			
			100																	
	合計				1	1														
1760.0	4	100	-			1								0.0	1.0	0.5				
		100		1																
合計				1	1															
陽性対照 (EMS)	880.0	4	100	-	1		4	1		3	2	1			0.0	10.0	10.0***	+		
			100								1									
			合計		1	11	2		3	2	2									
溶媒対照 (脱イソ水)	10% (v/v)	4	100	+			2								0.2	1.5	1.5	/		
			100																	
			合計				3													
検体	328.4	4	100	+										0.0	1.0	1.0				
			100			1	1													
	合計		1	1																
	574.7	4	100	+								1		0.0	0.5	0.5				
			100								1									
	合計											1								
1005.7	4	100	+											0.2	0.5	0.5				
		100																		
合計						1														
陽性対照 (CPA)	30.0	4	100	+			5	2		2	1	1		0.4	9.0	9.0***	+			
			100								1									
			合計				13	3		2	1	2								

陽性対照 EMS : エチルメタンスルホネート、CPA : シクロホスファミド Fisher の正確検定 * : $p < 0.05$ 、*** : $p < 0.001$ 空欄は異常細胞数 0 を示す。

+g ; ギャップを含む。 -g ; ギャップを含まない。 [+g] については統計学的計算を実施しなかった。

インギャップ : 色素が無い、あるいは、ほとんど無い染色分体あるいは染色体にみられるギャップ。

表 2. 2 回目試験

薬物	濃度 (µg/mL)	処理時間	観察細胞数	S-9 mixの有無	染色体異常を有する細胞数										倍染色体細胞の割合 (%)	異常細胞出現率 (%)		判定		
					ギャップ		染色体型				染色体型					他			+g (ギャップ)	-g (ギャップ)
					ギャップ	インギャップ	切断	断片	欠失	交換	同位切断	同位断片	同位欠失	交換		複合異常	染色体細粉化			
溶媒対照 (脱イソ水)	10% (v/v)	22	100	-	1											0.4	2.0	1.5	/	
			100			3														
			合計		1		3													
検体	574.7	22	100	-	1										0.0	3.0	2.5	-		
			100			2														
	合計	1		2	2				1											
	1005.7	22	100	-	1										0.2	2.0	1.5			
			100			3														
	合計	1		3																
1760.0	22	100	-	1	1	1								0.0	2.5	1.0				
		100			1															
合計	2	1	2																	
陽性対照 (EMS)	660.0	22	100	-			9	1		2					0.2	11.0	11.0***	+		
			100			10	3		1		2									
			合計			19	4		3		2									
溶媒対照 (脱イソ水)	10% (v/v)	4	100	+											0.2	0.5	0.0	/		
			100			1														
			合計		1		1													
検体	574.7	4	100	+			1							0.2	0.5	0.5				
			100			1														
	1005.7	4	100	+	1		2							0.0	2.0	1.5				
			100			1														
	合計	1		3																
	1760.0	4	100	+	1		1					1		0.0	3.0	2.5*				
100					3				1											
合計	1		4						2											
陽性対照 (CPA)	22.5	4	100	+			7			2	1			0.0	8.5	8.5***	+			
			100			8				2		1								
			合計			15			2	1	2		1							

陽性対照 EMS : エチルメタンサルホネート、CPA : シクロホスファミド Fisher の正確検定 * : p<0.05、*** : p<0.001 空欄は異常細胞数 0 を示す。

+g ; ギャップを含む。 -g ; ギャップを含まない。 [+g] については統計学的計算を実施しなかった。

インギャップ : 色素が無い、あるいは、ほとんど無い染色体あるいは染色体にみられるギャップ。